

تعیین تنوع ژنتیکی قارچ *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceri* عامل پژمردگی آوندی نخود ایرانی در استان ایلام با استفاده از نشانگرهای ISSR

مریم عظیمی¹، سعید رضائی^{2*}، سیامک بیگی³

تاریخ دریافت: 95/10/20 تاریخ پذیرش: 96/7/14

چکیده

بیماری پژمردگی فوزاریومی نخود ایرانی ناشی از قارچ *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceri* یکی از مهمترین بیماریهای این محصول در ایران می باشد. به منظور بررسی تنوع ژنتیکی این بیمارگر تعداد 47 جدایه از مناطق آلوده استان ایلام جداسازی و مورد بررسی قرار گرفت. پس از استخراج DNA بررسی تنوع ژنتیکی این جدایه‌ها با استفاده از نشانگرهای مولکولی ISSR صورت گرفت. بر اساس نتایج حاصله در سطح ضریب تشابه 64%، جدایه‌ها در 24 گروه قرار گرفتند. این نتیجه نشان دهنده تنوع ژنتیکی بالا در بین جدایه‌های قارچ در استان ایلام است. بر اساس اطلاعات بدست آمده از آغازگرهای ISSR در بین شش جمعیت مورد مطالعه بیشترین فاصله ژنتیکی (0/054) بین جمعیت‌های سرابله و سیروان و کمترین فاصله ژنتیکی (0/010) بین جمعیت‌های آسمان آباد و شهاب دیده شد. جریان ژنی و تمایز ژنتیکی با نرم‌افزار Pop GEN نشان داد که بیشترین جریان ژنی مربوط به ISSR₅ با مقدار 18/27 و کمترین میزان جریان ژنی مربوط به ISSR₇ با مقدار 1/65 بود و متوسط جریان ژنی 4/60 محاسبه شد. متوسط تمایز ژنتیکی در این تحقیق 0/098 بود. واریانس ژنتیکی محاسبه شده در بین جمعیت‌ها 6% و در میان جمعیت‌ها 94% بود. تنوع ژنتیکی بالا بین و درون جمعیت‌ها نشان دهنده احتمال توانایی بیماری‌زایی متفاوت در آنها است. این موضوع نشان دهنده اهمیت شناسایی نژادهای غالب بیمارگر در منطقه و به کارگیری آنها در فرآیند معرفی ارقام مقاوم به این بیماری می باشد.

واژه های کلیدی: *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceri*، تنوع ژنتیکی، نشانگر ریز ماهاوره ISSR.

¹ - دانش آموخته کارشناسی ارشد، گروه بیماری شناسی گیاهی، واحد علوم و تحقیقات تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.

² - استادیار، گروه بیماری شناسی گیاهی، واحد علوم و تحقیقات تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.

³ - استادیار، سازمان جهاد کشاورزی استان ایلام، ایلام، ایران.

* - نویسنده مسئول مقاله: s_rezaee_iau@yahoo.com

مقدمه

نخود ایرانی یا نخود معمولی با نام علمی *Cicer arietinum* L. یکی از محصولات زراعی مهم دنیا و تنها گونه قابل کشت این جنس است که به عنوان یک منبع مهم پروتئین، کربوهیدرات و ویتامین، بویژه در اقلیم‌های نیمه خشک دو قاره آسیا و آفریقا کشت داده می‌شود (Jukanti *et al.*, 2012). شواهد موجود از قدمت 12000 ساله کشت این محصول در منطقه خاورمیانه حکایت دارد (Tanno and Wilcox, 2006). براساس اطلاعات موجود، ایران در چند سال اخیر، با تولید سالانه 270000 تا 315000 تن نخود در سال، رتبه هفتم دنیا را از نظر تولید این محصول پس از کشورهایمانند هند، استرالیا، پاکستان، ترکیه و ایتالیایی به خود اختصاص داده است (Anonymous, 2014). پژمردگی و زردی فوزاریومی نخود، یکی از مهم‌ترین بیماریهای این گیاه در مناطق نخودکاری دنیا است که در سال‌های مختلف ممکن است بین 10 تا 100 درصد این محصول را نابود کند به طوری که میزان این خسارت در برخی از مزارع استان ایلام به 50 تا 70% می‌رسد (Nene and Reddy, 1987; Honnareddy *et al.*, 2006). بیمارگر باعث خسارت قابل توجهی در عملکرد می‌شود (Dahiya, 2003; Madhuri Katkar *et al.*, 2015). در بسیاری از مزارع بر اثر این بیماری اکثریت بوته‌های مزرعه زرد می‌شوند. این زردی از کم رنگ شدن و ریزش از بخش پایینی بوته‌ها شروع شده و بوته‌ها تا موقع برداشت ضعیف و کم رشد باقی می‌مانند. در حال حاضر، دو پاتوتیپ (پاتوتیپ ایجادکننده زردی و پاتوتیپ ایجادکننده پژمردگی) و هشت نژاد 0، 1A، 1B، 2، 3، 4، 5 و 6 برای این بیمارگر معرفی شده است که به ترتیب براساس علائم بیماری و پراکنش جغرافیایی با یکدیگر تفاوت‌هایی دارند (Jimenes-Fernandez *et al.*, 2013).

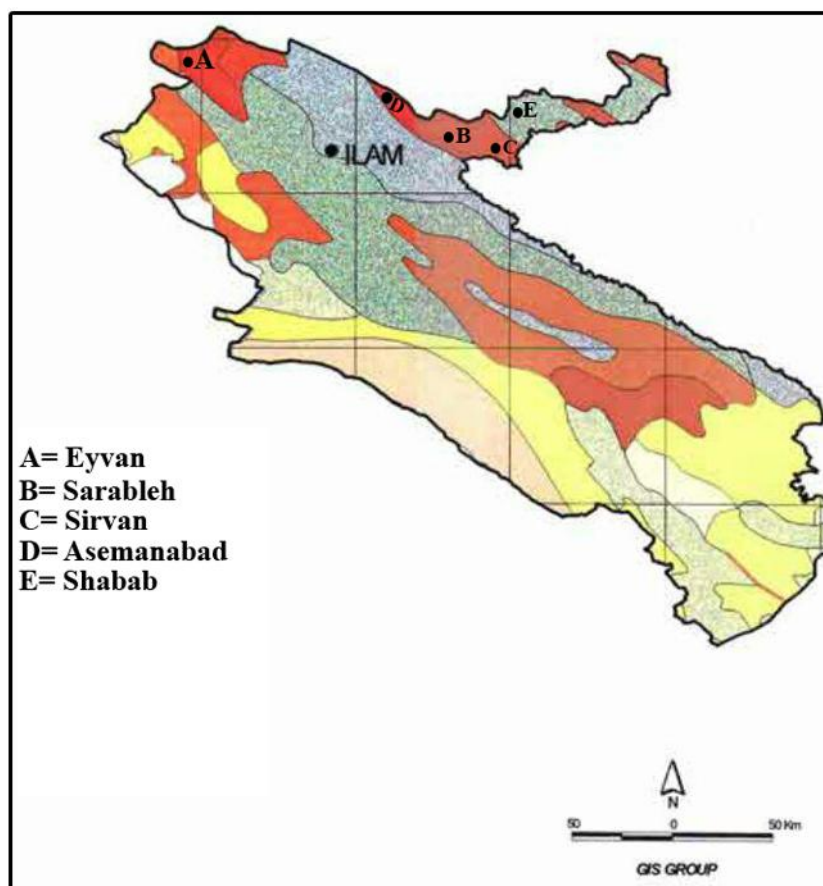
کنترل بیماری به دلیل زنده ماندن طولانی مدت عامل بیماری در غیاب گیاهان میزبان در خاک دشوار می‌باشد (Haware *et al.*, 1996). استفاده از ارقام مقاوم یا متحمل گیاهی به عنوان موثرترین روش برای کنترل این بیماری معرفی شده و در بسیاری از کشورها مورد استفاده قرار گرفته است (Nene and Reddy, 1987; Haware *et al.*, 2013; Jimenez-Gasco *et al.*, 2004; Sharma *et al.*, 2009; Jimenes-Fernandez *et al.*, 2013). اگرچه وجود چندین نژاد فیزیولوژیک در مورد این بیمارگر، کنترل آن را با استفاده از ارقام مقاوم مشکل ساخته است (Chalcrabati *et al.*, 2001).

با توجه به وجود تنوع و تفاوت قدرت بیماری‌زایی نژادها در مناطق جغرافیایی مختلف، مطالعه تنوع ژنتیکی و فنوتیپی این بیمارگر به منظور اتخاذ بهترین روش مبارزه با آنها در هر منطقه ضروری به نظر می‌رسد. با این حال، در زمینه استفاده از ارقام مقاوم گیاهی در مبارزه با این بیماری یک چالش مهم وجود دارد و آن تنوع بسیار زیاد عامل این بیماری در مناطق جغرافیایی مختلف است (Jimenes-Fernandez *et al.*, 2013). این تنوع باعث می‌شود که ارقام مقاوم معرفی شده در یک منطقه، کارایی لازم را برای تحمل خسارت این بیماری در سایر مناطق نداشته باشند. در حال حاضر، در چندین مطالعه تنوع ژنتیکی این بیمارگر با استفاده از نشانگرهای مولکولی مختلف و برای جدایه‌های جمع‌آوری شده از مناطق مختلف مورد بررسی قرار گرفته است (Zokaee *et al.*, 2012; Gajbhe Pravin *et al.*, 2016).

در این تحقیق از نشانگر ریز ماهواره ISSR بدلیل تکرار پذیری زیاد (در مقایسه با RAPD)، کم هزینه بودن (در مقایسه با AFLP) و بدون نیاز به اطلاعات اولیه از توالی هدف دو طرف نواحی تکراری جهت طراحی آغازگر (در مقایسه با SSR) برای بررسی تنوع ژنتیکی قارچ بیمارگر عامل بیماری پژمردگی آوندی نخود استفاده شد. این نشانگر میزان چند شکلی بیشتر و آشکار سازی راحت‌تری نسبت به نشانگرهای مولکولی دیگر دارد و جایگزین مناسبی می‌باشد.

مواد و روش‌ها

در طول فصل زراعی سال 1393-1394 بر اساس سابقه وقوع بیماری، نمونه‌برداری از مناطق ایلام، ایوان، سرابله، سیروان، شیباب و آسمان آباد انجام گرفت (شکل 1؛ جدول 1).



شکل 1- موقعیت مناطق نمونه برداری شده در استان ایلام

جدول 1- مشخصات جدایه‌های بدست آمده از قارچ *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceri* در مناطق مختلف.

ردیف	نام جدایه	محل جداسازی	ردیف	نام جدایه	محل جداسازی	ردیف	نام جدایه	محل جداسازی
1	Foc1	سیروان	20	Foc20	سیروان	43	Foc43	آسمان آباد
2	Foc2	سیروان	21	Foc21	ایوان	44	Foc44	آسمان آباد
3	Foc3	ایلام	22	Foc22	ایوان	45	Foc45	آسمان آباد
4	Foc4	ایلام	23	Foc23	سرابله	46	Foc46	آسمان آباد
5	Foc5	سیروان	24	Foc24	سیروان	47	Foc47	آسمان آباد
6	Foc6	ایلام	25	Foc25	ایوان			
7	Foc7	شباب	26	Foc26	شباب			
8	Foc8	سرابله	27	Foc27	شباب			
9	Foc9	سرابله	28	Foc28	ایوان			
10	Foc10	آسمان آباد	29	Foc29	آسمان آباد			
11	Foc11	ایلام	30	Foc30	آسمان آباد			
12	Foc12	آسمان آباد	31	Foc31	شباب			
13	Foc13	آسمان آباد	32	Foc32	آسمان آباد			
14	Foc14	آسمان آباد	33	Foc33	آسمان آباد			
15	Foc15	سیروان	34	Foc34	آسمان آباد			
16	Foc16	سیروان	35	Foc35	ایوان			
17	Foc17	شباب	36	Foc36	ایوان			
18	Foc18	شباب	37	Foc37	آسمان آباد			
19	Foc19	شباب	38	Foc38	آسمان آباد			
20	Foc20	سیروان	39	Foc39	آسمان آباد			
21	Foc21	ایوان	40	Foc40	ایوان			
22	Foc22	ایوان	41	Foc41	آسمان آباد			
23	Foc23	سرابله	42	Foc42	ایوان			

تاریخ جداسازی جدایه‌های Foc1 تا Foc16 سال 1393 و جدایه‌های Foc17 تا Foc47 سال 1394 می‌باشد.

نمونه‌های جمع آوری شده بر اساس نشانه‌های بیماری به آزمایشگاه منتقل شدند. در آزمایشگاه از حد فاصل بافت‌های آلوده و سالم از ناحیه طوقه و ریشه نمونه‌هایی تهیه شد، سپس این نمونه‌ها با اتانول 70% به مدت 10 ثانیه و هیپوکلریت سدیم 0/5 درصد به مدت 30 ثانیه ضد عفونی سطحی و با آب مقطر استریل به ترتیب به مدت یک و پنج دقیقه شستشو و با کاغذ صافی خشک گردیدند. سپس روی محیط کشت عصاره سیب زمینی - دکستروز - آگار (PDA) کشت داده شدند. جدایه‌های به دست آمده به روش تک اسپور کردن خالص سازی شدند. شناسایی

جدایه‌های فوزاریوم بر اساس ویژگی‌های ماکروسکوپی و میکروسکوپی صورت گرفت (Burgess *et al.*, 1994; Nelson *et al.*, 1983).

در آزمون بیماری‌زایی مخلوطی از شن و پودر نخود (45 گرم شن + 5 گرم پودر نخود) در یک ارلن 250 میلی لیتری به همراه یک تکه هفت میلی متری از قارچ رشد یافته در محیط کشت PDA ریخته شدند و به مدت 10 روز در دمای °C 23 درجه نگهداری گردیدند. بعد از این مدت زادمایه حاصله با یک کیلوگرم خاک استریل شده در اتوکلاو مخلوط و در گلدانهای 15 cm ریخته شد. در هر گلدان 500 گرمی، پنج عدد بذر کشت داده شد و به مدت 40 روز در دمای °C 25 ± 1 با رطوبت نسبی 50-30 درصد و 14 ساعت روشنایی و 10 ساعت تاریکی قرار داده شدند. به منظور تعیین بیماری‌زایی جدایه‌های فوزاریوم از رقم بومی جم که در تمام شهرستان‌های استان ایلام کشت می‌شود و حساسیت بالایی به بیماری دارد استفاده گردید. هر تیمار دارای چهار تکرار بود و آزمایش نیز دوبار تکرار گردید. برای گلدان‌های شاهد از خاک استریل شده بدون زادمایه استفاده شد. پس از 40 روز واکنش بیماری‌زایی جدایه‌ها (47 جدایه) بر اساس روش خیمنز-دیاز و همکاران ارزیابی گردید که در آن گیاهان بر اساس علائم بیماری به صورت مقاوم (20-0 درصد پژمردگی)، حساسیت متوسط (50-20 درصد پژمردگی) و حساس (بیش از 50 درصد پژمردگی) تقسیم بندی شدند (Jimenez-Diaz *et al.*, 1989). در این آزمون درصد پژمردگی و زردی در بوته‌ها در هر تیمار به عنوان علائم بارز بیماری در نظر گرفته شد.

استخراج DNA

بعد از رشد قارچ روی محیط کشت PDA از حاشیه پرگنه تازه تشکیل شده تکه‌هایی توسط یک سوزن استریل به محیط جدید PDA انتقال داده شد و در دمای °C 25 در تاریکی به مدت دو هفته نگهداری شدند. در مرحله بعد بر اساس خصوصیات ماکروسکوپی و مشخصات میکروسکوپی از پرگنه‌های متعلق به 47 جدایه Foc رشد یافته روی محیط PDA برای استخراج DNA با روش CTAB (Doyle and Doyle, 1987) با اندکی تغییرات (در مرحله دوم از آنزیم پروتئیناز k برای حذف پروتئینها استفاده شد و در مراحل شستشو به جای دو بار شستشو یک بار شستشو انجام گرفت) استفاده شد.

نشانه‌گر ISSR

تعداد 10 آغازگر جهت تعیین تنوع ژنتیکی قارچ مورد استفاده قرار گرفتند. این آغازگرها بر اساس منابع و تحقیقات قبلی (Bayraktar *et al.*, 2008) توسط شرکت سیناکلون سنتز و بعد از افزودن مقداری آب تزریقی مطابق با دستورالعمل شرکت سازنده به مقدار لازم رقیق شده و مورد استفاده قرار گرفتند (جدول 2).

واکنش PCR در حجمی از محلول واکنش به اندازه 25 میکرولیتر شامل ترکیبات زیر انجام شد. دو و نیم میکرولیتر بافر PCR 10x، یک میکرولیتر مخلوط dNTPs (10mM) و 0/3 میکرولیتر (10 pmol) از هر آغازگر، یک واحد آنزیم Taq Polymerase، سه میکرولیتر DNA ژنومی (حاوی 30 نانوگرم DNA)، یک میکرولیتر 50 mM MgCl₂ و یک واکنش به عنوان کنترل آلودگی بدون افزودن DNA الگو انجام گرفت.

تکثیر در دستگاه ترموسایکلر شرکت (Eppendorf master) با برنامه حرارتی واسرشت سازی اولیه در °C 95 به مدت سه دقیقه و 40 چرخه شامل واسرشت سازی در °C 94 به مدت یک دقیقه، دمای °C 54-50 به مدت یک

دقیقه برای اتصال آغازگرها، 72 °C به مدت دو دقیقه برای توسعه و در نهایت 72 °C به مدت هفت دقیقه برای توسعه نهایی (Arvaio-Ortiz *et al.*, 2011) انجام گرفت و محصولات در دمای 4 °C نگهداری شدند. برای مشاهده محصول واکنش PCR پنج میکرولیتر از آن به مدت 60 - 50 دقیقه در دستگاه Gel Documentation مدل Intas در 80 ولت الکتروفورز گردید. برای رنگ آمیزی ژل از محلول سیف استین (safe stain) در زمان تهیه ژل به مقدار سه میکرولیتر در 100 cc محلول آگارز استفاده شد.

جدول 2- مشخصات آغازگرهای مورد استفاده.

نام آغازگر	توالی آغازگر	دمای اتصال	G+C content %
ISSR ₁	AGAGAGAGAGAGAGAGG	52	52/9
ISSR ₂	GAGAGAGAGAGAGAT	50	47/1
ISSR ₃	GAGAGAGAGAGAGAC	50	52/9
ISSR ₄	ACACACACACACACT	50	47/1
ISSR ₅	AGAGAGAGAGAGAGAYT	52	47/2
ISSR ₆	AGAGAGAGAGAGAGAYC	55	52/8
ISSR ₇	GAGAGAGAGAGAGAYT	53	47/2
ISSR ₈	GAGAGAGAGAGAGAYC	54	52/8
ISSR ₉	CACACACACACACART	52	47/2
ISSR ₁₀	ACACACACACACACYT	52	47/2

Y=Pyrimidine; R=Purine

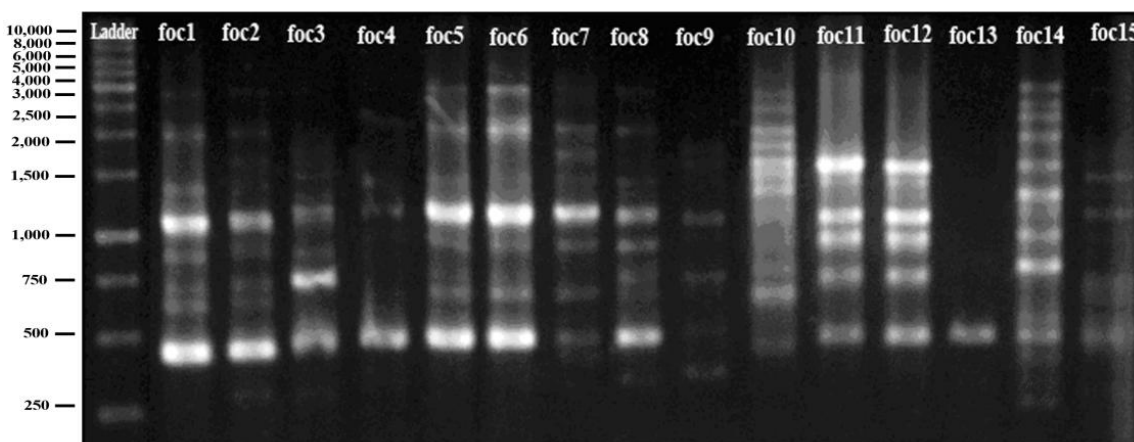
تجزیه و تحلیل داده‌های حاصل از ISSR

به منظور تعیین میزان تشابه جدایه‌های *F. oxysporum* f.sp. *ciceri* ابتدا باندهای واضح در تصاویر ژل‌ها مشخص شدند. سپس داده‌ها بر حسب وجود و یا عدم وجود باند وارد نرم‌افزار Excel گردیدند. ماتریس تشابه بین جفت جدایه‌ها با استفاده از ضریب تشابه دایس با نرم‌افزار NTsys ver. 2.02 نیز بررسی شد. جهت بررسی تنوع ژنتیکی بین و درون جمعیت‌های قارچ نیز تجزیه واریانس مولکولی داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار Gen Alex ver.6.501 انجام گردید. اجزای واریانس محاسبه و سهم هر یک از آنها در تنوع کل نیز مورد ارزیابی قرار گرفت. فاصله ژنتیکی بین جمعیت‌ها از ضریب نی محاسبه و بدین ترتیب ماتریس فاصله ژنتیکی بین جمعیت‌ها تهیه شد. میانگین تنوع ژنی، ضریب شانون (میزان غنای گونه‌ای) و میزان چند شکلی، میانگین تعداد آلل مشاهده شده و متوسط تعداد آلل مؤثر در هر جایگاه ژنی، با استفاده از نرم‌افزار Gen Alex ver.6.501 بدست آمد. میانگین GSt و میزان جریان ژنی (Nm) از FSt مطابق فرمول $Nm=0/25 (1-FSt)FSt$ با استفاده از نرم‌افزار Gen Alex ver.6.501

انجام گرفت. برای به دست آوردن ضریب کوفتیک¹ به منظور تعیین بهترین دندروگرام از نرم‌افزار DARwin استفاده گردید.

نتایج

نتایج آزمون بیماری‌زایی بیانگر بیماری‌زا بودن همه جدایه‌ها بود که البته جدایه‌های مختلف از نظر شدت بیماری‌زایی با یکدیگر تفاوت داشتند. از جایگاه‌های ISSR که در این مطالعه استفاده شده است، در مجموع 368 باند DNA تکثیر شد. بیشترین تعداد آلل (12 آلل در جایگاه ژنی) در آغازگر ISSR4 دیده شد و کمترین تعداد آلل (هفت آلل در جایگاه ژنی) در آغازگرهای ISSR3 و ISSR8 مشاهده گردید (شکل 2).



شکل 2- باندهای DNA حاصل از تکثیر آغازگر ISSR9 در قارچ *F. oxysporum* f. sp. *ciceri*

فراوانی آلل‌ها در جمعیت شباب با 15 آلل بیشترین و در جمعیت سیروان با هشت آلل کمترین میزان فراوانی را داشتند. آسمان آباد با 0/174 بیشترین تنوع آللی و جمعیت ایوان با 0/126 کمترین میزان تنوع آللی را داشتند. در این مطالعه تعدادی آلل منحصر به فرد یافت شد که سه عدد بودند. از این آلل‌ها دو عدد مربوط به جمعیت ایوان و یک عدد مربوط به جمعیت سرابله بود (جدول 3).

آغازگر ISSR₅ با 56% دارای بیشترین میزان چند شکلی بود و ISSR₈ کمترین میزان اطلاعات چند شکلی (24%) را نشان داد و نسبت چندگانه مؤثر برای 10 آغازگر بین 6 تا 12 با میانگین 8/5 بود. مقدار محاسبه شده شاخص نشانگر در آغازگرهای مورد مطالعه از 1/8 تا 6/7 متغیر بود. بیشترین مقدار شاخص نشانگر مربوط به آغازگر ISSR₅ بود. متوسط شاخص نشانگر برای نشانگرهای مورد مطالعه 3/86 بود که نشان‌دهنده قدرت تفکیک زیاد این آغازگرهاست (جدول 4).

¹ - Cophenetic

جدول 3- الگوی باند دهی در جمعیت های مورد بررسی

جمعیت ها	فراوانی آلل ها	آلل های منحصر به فرد	میانگین تنوع آلل ها
ایلام	8	-	0/143
آسمان آباد	13	-	0/174
سرابله	13	1	0/165
شباب	15	-	0/170
سیروان	7	-	0/141
ایوان	10	2	0/126

جدول 4- نتایج حاصل از استفاده آغازگرهای مختلف برای تعیین تنوع ژنتیکی جدایه های *F. oxysporum* f. sp. *ciceri*

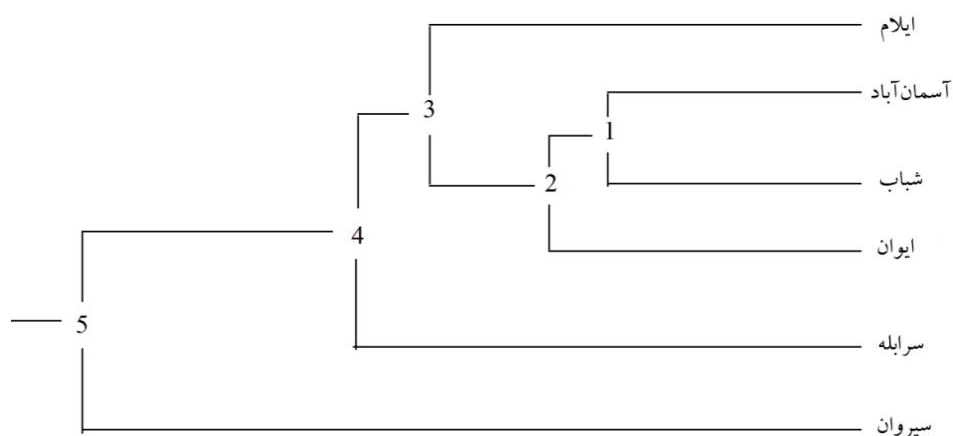
نام آغازگر	اندازه آللها (bp)	تعداد آلل های تکثیر شده	نسبت چندگانه مؤثر	شاخص نشانگر	PIC
ISSR1	210-260	8	8	2/8	0/35
ISSR2	160-250	7	7	2/2	0/31
ISSR3	195-240	8	8	2/8	0/35
ISSR4	155-250	7	7	1/8	0/26
ISSR5	165-275	12	12	6/7	0/56
ISSR6	150-290	11	11	5/4	0/48
ISSR7	165-270	9	9	6/3	0/32
ISSR8	150-190	7	7	2/5	0/24
ISSR9	165-180	6	6	3/6	0/36
ISSR10	130-225	10	10	4/5	0/45
میانگین	-	8/5	8/5	3/86	0/36

محتوای اطلاعات چند شکلی = PIC=Polymorphism Information Content

میزان تشابه ژنتیکی جدایه ها از صفر تا یک متغیر بود. میانگین فاصله ژنتیکی 55% محاسبه گردید. بیشترین شباهت بین جدایه های (Foc18, Foc9)، (Foc33, Foc3)، (Foc25, Foc19, Foc11)، (Foc22, Foc43) با فاصله ژنتیکی صفر بود و کمترین تشابه با فاصله ژنتیکی یک بین بسیاری از جدایه ها از جمله بین جدایه های (Foc26, Foc4) و (Foc18, Foc11) دیده شد.

در تجزیه ی خوشه ای جمعیت ها به طور کلی دو گروه مشخص قرار گرفتند. یک گروه از آنها 5 عضوی و گروه دیگر تک عضوی بود. گروه اول شامل جمعیت های ایلام، آسمان آباد، شباب، ایوان و سرابله بود. در گروه دوم

جمعیت سیروان قرار گرفت. در گروه اول سرابله از چهار جمعیت دیگر متمایز شد. بر این اساس کمترین فاصله‌ی ژنتیکی بین جمعیت‌های آسمان‌آباد و شباب شد (شکل 3).

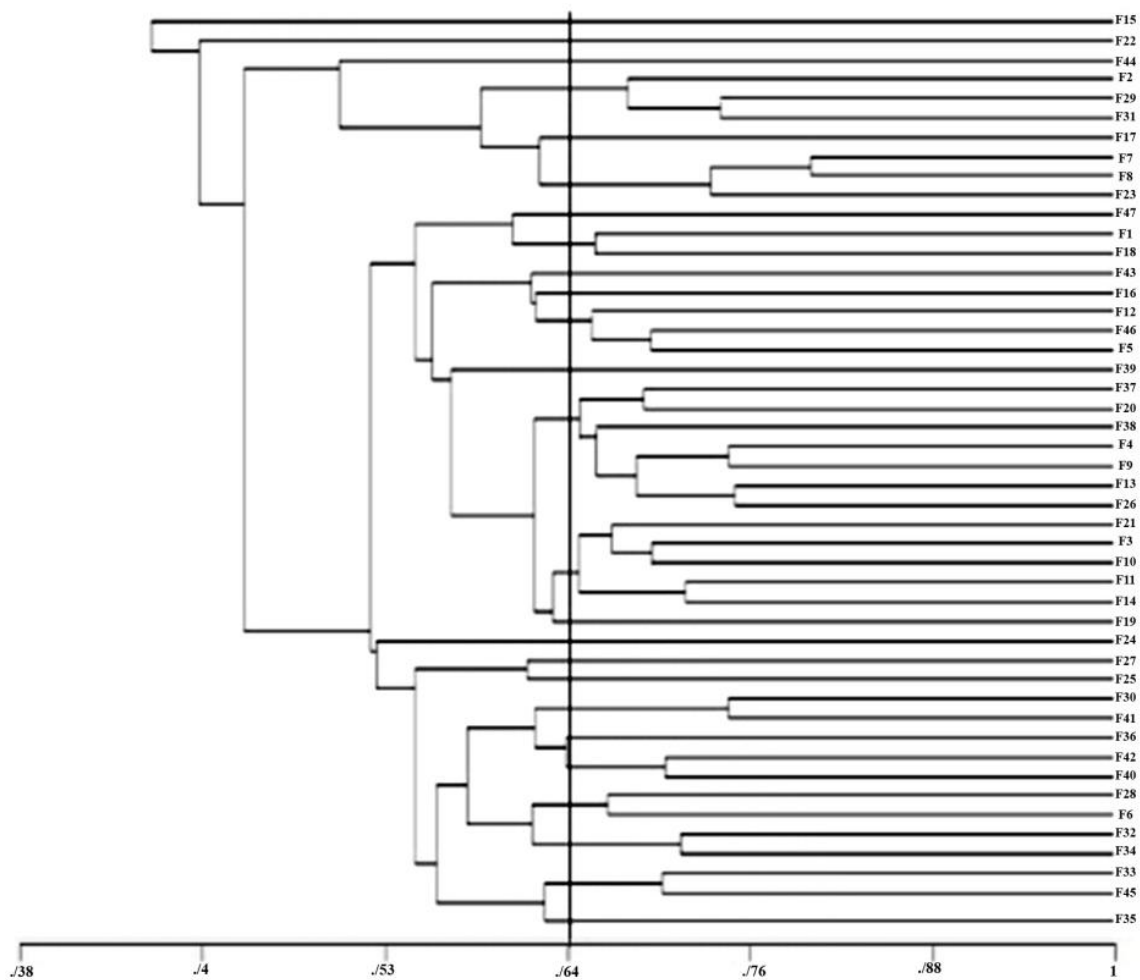


شکل 3- گروه‌بندی جمعیت‌های *F. oxysporum* f. sp. *ciceri* بر اساس ضریب تشابه دایس و نرم افزار NTsys.

در دندروگرام بدست آمده جدایه‌ها در فاصله ژنتیکی 1- 0/5 قرار گرفتند. در فاصله 64% بیست و چهار گروه تشخیص داده شد. این گروه‌ها شامل 12 گروه تک عضوی، هفت گروه دو عضوی، سه گروه سه عضوی، یک گروه پنج عضوی و یک گروه هفت عضوی بودند. بر اساس اطلاعات بدست آمده از آغازگر ISSR میانگین فاصله ژنتیکی و شباهت ژنتیکی در بین شش جمعیت مورد مطالعه در این تحقیق محاسبه گردید. کمترین فاصله ژنتیکی 10% بین جمعیت‌های آسمان‌آباد و شباب مشاهده گردید و بیشترین فاصله ژنتیکی 54% بین جمعیت‌های سرابله و سیروان بود (شکل 4).

به منظور بررسی تنوع جدایه‌های هر جمعیت و تنوع میان جمعیت‌های مختلف از تجزیه واریانس مولکولی استفاده شد. بر اساس نتایج تجزیه واریانس مولکولی میزان تنوع ژنتیکی درون جمعیت‌ها 94% و تنوع بین جمعیت‌های مختلف برابر با 6% بود که نشان می‌دهد جمعیت‌ها از لحاظ ژنتیکی بسیار به یکدیگر نزدیکند. نتایج تجزیه واریانس مولکولی درون جمعیت‌ها نشان داد که بیشترین تنوع درون جمعیت در جمعیت آسمان‌آباد معادل 23/6 درصد می‌باشد. همچنین تنوع درون جمعیت‌های شباب، سرابله، ایوان، ایلام و سیروان به ترتیب 19/778، 15/143، 15/111، 10/667 و 7/500 درصد به دست آمد.

ضریب شانون یکی دیگر از معیارهای تنوع ژنتیکی است که این ضریب در کل جمعیت‌ها برابر 0/244 ارزیابی شد. بیشترین مقدار ضریب شانون در جمعیت آسمان‌آباد 0/282 بود و کمترین مقدار این ضریب در جمعیت ایوان 0/205 مشاهده گردید. با توجه به نتایج به دست آمده جمعیت آسمان‌آباد دارای بیشترین تنوع ژنتیکی بود. فاصله ژنتیکی و شباهت ژنتیکی در بین شش جمعیت مورد مطالعه، محاسبه گردید. کمترین فاصله ژنتیکی 10% بین جمعیت‌های آسمان‌آباد و شباب مشاهده گردید و بیشترین فاصله ژنتیکی 54% نیز بین جمعیت‌های سرابله و سیروان دیده شد (جدول 5).



شکل 4- گروه بندی جدایه‌های *F. oxysporum f. sp. ciceri* در ده نشانگر با استفاده از ضریب دایس و الگوریتم UPGMA و نرم‌افزار NTsys.

در جایگاه‌های مورد بررسی در این پژوهش بیشترین جریان ژنی مربوط به $ISSR_5$ با مقدار $18/27$ و کمترین میزان جریان ژنی مربوط به $ISSR_7$ با مقدار $1/65$ بود و متوسط جریان ژنی $7/481$ محاسبه شد و متوسط تمایز ژنتیکی در این تحقیق $0/1002$ محاسبه گردید (جدول 6).

جدول 5- میزان تنوع ژنتیکی در جمعیت‌های قارچ *F. oxysporum* f. sp. *ciceri* بر اساس جایگاه ریزماهوره ISSR.

جمعیت	اندازه جمعیت	تعداد آل‌های مشاهده شده (Na)	تعداد آل‌های موثر (Ne)	ضریب شانون (I)	تنوع ژنی (H)	درصد چندشکلی
ایلام	6	0/947	1/219	0/224	0/143	47/37
آسمان‌آباد	10	1/368	1/257	0/282	0/174	68/42
سرایله	7	1/368	1/248	0/270	0/165	68/42
شباب	9	1/474	1/250	0/280	0/170	73/68
سیروان	6	0/737	1/256	0/206	0/141	36/84
ایوان	9	1/053	1/190	0/205	0/126	52/63
میانگین	47	1/158	1/237	0/244	0/153	57/89

Na= observed number of alleles; Ne= Effective number of alleles; I= Shannon's Information index; H= Gene diversity

جدول 6- میزان جریان ژنی در 10 جایگاه مورد مطالعه

Nm**	Gst*	Hs	Ht	اندازه	جایگاه ژنی
9/89	0/048	0/018	0/019	47	1
3/88	0/114	0/073	0/082	47	2
9/39	0/050	0/106	0/112	47	3
4/33	0/104	0/136	0/152	47	4
18/27	0/027	0/084	0/086	47	5
15/06	0/032	0/482	0/498	47	6
1/65	0/233	0/167	0/218	47	7
7/21	0/065	0/125	0/134	47	8
2/28	0/180	0/195	0/238	47	9
2/85	0/149	0/234	0/275	47	10
7/481	0/1002	0/162	0/1814	47	میانگین

* تمایز ژنتیکی ** جریان ژنی

بحث

نخود در حال حاضر یکی از مهم‌ترین محصولات کشاورزی از نظر سطح زیرکشت و اهمیت اقتصادی در داخل کشور می‌باشد. در بین همه راه‌های کنترل بیماری پژمردگی فوزاریومی نخود، استفاده از ارقام مقاوم یا متحمل یکی از مطمئن‌ترین و اقتصادی‌ترین روش‌های مبارزه می‌باشد. با شناسایی گروه‌های جمعیتی بیمارگر می‌توان به

شناسایی ارقام مقاوم در هر منطقه مبادرت نمود و این خود مستلزم انجام آزمون‌های بیماری‌زایی و بررسی عکس‌العمل در برابر بیمارگر است. آگاهی از میزان تنوع ژنتیکی جمعیت‌های قارچ عامل بیماری ضروری است. نتایج این تحقیق بیانگر وجود تنوع ژنتیکی جدایه‌های *F. oxysporum* جدا شده از نخود در مناطق مورد بررسی با استفاده از دندروگرام‌های ترسیم شده با ضریب دایس می‌باشد. در این تحقیق تنوع ژنتیکی قارچ عامل بیماری پژمردگی آوندی نخود با استفاده از نشانگرهای ISSR مورد بررسی قرار گرفت. مناطق نمونه‌برداری شامل شش جمعیت مختلف بودند. ذکائی و همکاران¹ (2012) در بررسی تنوع ژنتیکی جدایه‌های *F. oxysporum* f.sp. *ciceri* از نشانگرهای RAPD و PCR-RFLP استفاده کردند. نتایج نشان داد که تکنیک PCR-RFLP نتوانست جدایه‌ها را بر اساس منشا جغرافیایی از هم تفکیک کند اما جدایه بیماری‌زا از دیگر جدایه‌ها متمایز شد. در مطالعه Madhuri و Katkar (2015) نتایج نشان داد که در آنالیز ترکیبی تنوع ژنتیکی چهار نژاد از پاتوژن *F. oxysporum* f.sp. *ciceri* به وسیله 23 آغازگر RAPD و 15 آغازگر ISSR سطح بالایی از چند شکلی را نشان داد.

نتایج مطالعه‌ی دیگر حاکی از این بود که نشانگرهای مولکولی به طور موفقیت آمیزی تنوع ژنتیکی در نخود زراعی را آشکار می‌کنند به طوری که این تنوع بزرگتر از تنوعی بود که در مطالعات قبلی توسط ایزوزایم‌ها یا پروتئین‌های ذخیره‌ای بذر آشکار شده بود (Iruela et al., 2002). نشانگرهای RFLP و نشانگرهای مبتنی بر PCR برای بررسی تنوع ژنتیکی در 10 ژنوتیپ نخودفرنگی استفاده شد و نتایج حاکی از این بود که تنوع ژنتیکی به دست آمده از نشانگر RFLP کمتر از تنوع ژنتیکی حاصل از روش‌های مبتنی بر PCR بود (Lu et al., 1996). آنالیز تنوع ژنتیکی جمعیت‌های باقلای مدیترانه‌ای با نشانگر ISSR و با استفاده از چهار آغازگر آنالیز شد که درصد باندهای چند شکل مشاهده شده در این مطالعه بیشتر از AFLP و RAPD در مطالعات قبلی بود (Terzopoulos and Bebeli, 2008). در مطالعه‌ای برای بررسی تنوع ژنتیکی 18 ژنوتیپ نخود سیاه، نشانگرهای ISSR و RAPD مورد استفاده قرار گرفت (Souframanien and Gopalakrishna, 2004). نتایج نشان داد که چندشکلی آشکار شده توسط 16 آغازگر ISSR (57/4 درصد) بیشتر از 25 آغازگر اختیاری RAPD (42/7 درصد) بود. Rao و همکاران (2007) در مطالعه‌ای به منظور آشکارسازی روابط ژنتیکی بین 19 رقم نخود زراعی و پنج نژاد وحشی قارچ، از نشانگرهای ISSR و RAPD استفاده کردند. تجزیه ISSR نشان داد که حتی با شش آغازگر چند شکل ارزیابی قابل اعتمادی از تنوع ژنتیکی حاصل می‌شود در حالی که تقریباً 30 آغازگر برای RAPD لازم می‌باشد.

یکی از نیروهای تکاملی که نقش بسیار مهمی در تنوع ژنتیکی یک جمعیت دارد، جریان ژنی (gene flow) است. در غیاب آن، پایین بودن جریان ژنی باعث تفاوت در فراوانی آلل‌ها در جایگاه‌های ژنی خنثی درون جمعیت می‌گردد و همچنین باعث افزایش تمایز جدایه‌ها در جمعیت‌ها می‌شود (Nourollahi et al., 2014). در تحقیق حاضر میزان جریان ژنی (Nm) متوسط و 0/519 و تمایز ژنتیکی (Gst) نیز به میزان کمی 0/490 مشاهده گردید. با تخمین جریان ژنی، می‌توان میزان جریان ژنی که از تمایز جمعیت‌ها جلوگیری می‌کند، مشخص نمود. طبق تعریف جریان ژنی اگر جریان ژنی بیشتر از یک باشد، تفاوت کمی بین جمعیت‌ها وجود دارد (Jalali Siahkal Rodi and

¹ - Zokaee et al.

(Aghaii, 2016). پس این تحقیق نشان می‌دهد که تمایز زیادی در میان جمعیت‌ها وجود دارد. در جایگاه‌های مورد بررسی در این پژوهش بیشترین جریان ژنی مربوط به جایگاه پنج با مقدار $18/27$ و کمترین میزان جریان ژنی مربوط به جایگاه هفت با مقدار $1/65$ و متوسط جریان ژنی $4/60$ محاسبه شد. دندروگرام رسم شده بر اساس فاصله ژنتیکی بین جمعیت‌های مورد مطالعه در این تحقیق، نشان داد که در بین شش جمعیت مورد بررسی، جمعیت آسمان آباد و شهاب بیشترین شباهت را نشان داده و این دو بیشترین تفاوت را با جمعیت سیروان نشان می‌دهند. تفاوت سیروان با بقیه جمعیتها بیشتر از همه است. در این مطالعه تنوع ژنتیکی زیادی میان جمعیت آسمان آباد معادل $23/6$ درصد مشاهده گردید.

بر اساس نتایج تجزیه واریانس مولکولی میزان تنوع ژنتیکی درون جمعیت‌ها 94% و تنوع بین جمعیت‌های مختلف برابر با 6% بود که نشان می‌دهد جمعیت‌ها از لحاظ ژنتیکی بسیار به یکدیگر نزدیکند. تمایز کمتر بین جمعیت‌ها نسبت به داخل جمعیت‌ها نشان دهنده این است که گروه بندی صورت گرفته برای جدایه‌ها در تفکیک جدایه‌ها بر اساس شباهت آن‌ها موفق عمل کرده است و جمعیت‌ها در دندروگرام حاصل، از افراد متفاوتی تشکیل شده‌اند، اما بین این جمعیت‌ها تنوع کم و در عین حال معنی‌داری وجود دارد.

از بررسی‌های انجام شده برای گروه بندی توده‌ها و ارقام هسته مرکزی نخود ایرانی چنین استنباط می‌شود که سطح تنوع ژنتیکی موجود در آنها در حد مطلوبی است. به این معنی که نشانگر ISSR ابزار مهمی جهت مطالعه تنوع ژنتیکی در نخود می‌باشد. همچنین این نتایج می‌تواند نقطه عطف مهمی برای برنامه‌های اصلاحی و حفاظت ژرم پلاسما توده‌های بومی نخود زراعی باشد. به طوری که در آینده می‌توان با برنامه‌های اصلاحی مناسب در جهت افزایش عملکرد، کیفیت و سازگاری این گیاه در کشور گام‌های اساسی برداشت.

درک کنونی ما از میزان تنوع ژنتیکی موجود در این گونه، محدود به بررسی جدایه‌های در دسترس می‌باشد. به هر حال کسب اطلاعات دقیق‌تر از تنوع ژنتیکی این قارچ وابسته به ادامه تحقیق با استفاده از جدایه‌های بیشتر از مناطق مختلف کشور و همچنین به کارگیری نشانگرهای مولکولی دقیق و پیشرفته‌تر می‌باشد.

نتایج در این تحقیق نشان داد که هم تنوع بین جمعیت و هم درون جمعیت بالاست که ممکن است به خاطر جهش و هیبریداسیون سوماتیکی باشد. همچنین تنوع ژنتیکی بالا بین و درون جمعیت‌ها نشان دهنده توان بیماری‌زایی در آنهاست. به همین خاطر استفاده از ارقام مقاوم در منطقه از اهمیت بالایی برخوردار است. همچنین از نشانگرهایی که تعداد آلل بیشتری دارند، می‌توان در مطالعات بعدی جهت مطالعه تنوع ژنتیکی و مطالعه در مورد کنترل بیماری به کار برد. از طرف دیگر رعایت بهداشت زراعی در این منطقه از کشور بخاطر تنوع بالای این گونه قارچ، شرایط محیطی و یکنواختی بذر پیشنهاد می‌شود تا از اپیدمی شدن این قارچ جلوگیری شود.

در مجموع با توجه به نتایج حاصل از تجزیه خوشه‌ای بر اساس ضریب دایس می‌توان نتیجه گرفت که تکنیک

ISSR یک تکنیک مفید و سودمند در بررسی تنوع ژنتیکی درون گونه‌های قارچی از جمله *F. oxysporum* است.

References

1. Anonymous. 2014. Production of chickpea by countries. [cited 2017 Nov 11]. Available from: <https://en.wikipedia.org/wiki/FAO> "o 'FAO 'UN food & Agriculture Organization.
2. Arvaio-ortiz M, Esqueda M, Acedo-Felix E, Sanchez A and Gutierrez A. 2011. Morphological variability and races of *Fusarium oxysporum* f.sp. *ciceris* associated with chickpea (*Cicer arietinum*) crops. American Journal of Agricultural and Biological Science 6: 114–121.
3. Bayraktar H, Dolar S and Maden S. 2008. Use of RAPD and ISSR marker in detection of genetic variation and population, structure among *Fusarium oxysporum* f.sp. *ciceri* isolates on chickpea in Turkey. Phytopathology13: 164–154.
4. Burgees L, Summerell W, Bullock S, Gott KP and Backhouse D. 1994. Laboratory manual for *Fusarium* Research. Sidney: University of Sidney Press. 133 p.
5. Chalcrabati A, Mukherjee PK, Sherkhane PD, Baghwat AS and Murthy NBK. 2001. A simple and rapid molecular method for distinguishing between races of *Fusarium oxysporum* f.sp. *ciceri* form India. Current Science 4: 571–575.
6. Dahiya BS. 2003. Improved cultivar and agricultural practices for chickpea promotion in Punjab and Haryana. pp. 17–24, In: Proceeding and recommendations: Chickpea production and productivity contracts. ISAR New Delhi,.
7. Doyle JJ and Doyle JL. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. Phytochemistry Bulletin 19: 11–15.
8. Gajbhe Pravin D, Madhuri Katkar S, Mane S and Jadhav PV. 2016. Pathogenic and molecular characterization of *Fusarium oxysporam* f.sp. *ciceri* causing chickpea wilt through ISSR markers. International Journal of Environmental Agriculture and Biotechnology 1: 224–227.
9. Haware MP, Nene YL and Natarajan M. 1996. Survival of *Fusarium oxysporum* f.sp. *ciceri* in soil absence of chickpea. Phytopathologia Mediterranea, 35: 9–12.
10. Honnareddy N and Dubey SC. 2006. Pathogenic and molecular characterization of Indian isolates of *Fusarium oxysporam* f.sp. *ciceri* causing chickpea wilt. Current Science 5:661–666.
11. Iruela M, Rubio J, Curbero J, Gil J and Millan T. 2002. Phylogenetic analysis in the genus *cicer* and cultivated chickpea using RAPD and ISSR markers. European Journal of Plant pathology 119: 29–37.
12. Jalali Siahkal Rodi Z and Aghaii MJ. 2016. Investigation of genetic diversity among Iranian population of Artemisia (*Artemisia absinthium*) using by ISSR Markers. Paper presented at: 2th International & 14th Iranian Genetics Congress; 21–23 May; Tehran, Iran.
13. Jimenez- Gasco M, Naves-Cortes JA and Jimenez-Diaz, RM. 2004. The *Fusarium oxysporum* f.sp. *cicer/Cicer arietinum* phatosystema: a case study of the evolution of plant-pathogenic fungi into races and pathotype. International Microbiology 7: 95–104.

14. Jimenez-Díaz RM, Trapero-Casas A and Cabrera de la Colina J. 1989. Races of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* infecting chickpeas in southern Spain. pp. 515–520, In EC Tjamos and C Beckman (eds). Vascular wilt diseases of plants. Springer-Verlag: Berlin, Germany.
15. Jimenez-fernandez D, Landa BB, Rafael SK, Jimenez Diaz M and Navas-cortes JA. 2013. Quantitative and microscopic assessment of compatible and incompatible interaction between chickpea cultivars and *fusarium oxysporum* f.sp. *ciceris* Races. PlosOne 8: 613–628.
16. Jukanti AK, Gaur PM, Gowda CLL and Chibbar RN. 2012. Nutritional quality and health Benefits of chickpea (*Cicer arietinum* L.): A Review. British Journal of Nutrition 108:11–26.
17. Lu J, Knox MR, Ambrose MJ, Brown JKM and Ellis THN. 1996. Comparative analysis of genetic diversity in pea assessed by RFLP and PCR based methods. Theoretical and Applied Genetics 93: 1103–1111.
18. Madhuri Katkar S, Mane S and Niveditak K. 2015. Molecular characterization races of *Fusarium oxysporum*. f.sp. *ciceri* using RAPD and ISSR markers. Legume Research 2: 246–252.
19. Nelson PE, Toussoun TA and Marasas WFO. 1983. *Fusarium* species: An Illustrated Manual of Identification. The Pennsylvania State University Press. University Park. 206 p.
20. Nene YL and Reddy MV. 1987. Chickpea disease and their control. pp. 233–270, In Saxena, MC and Singh KB (eds). The chickpea. CAB International: Oxon, UK.
21. Nourollahi Kh, Aliaran A, Yonessi H. 2014. Genetic diversity of *Fusarium oxysporium* f. sp. *ciceri* isolates causal agent of wilt chickpea in Kermanshah province using microsatellite markers. Modern Genetics Journal 11: 31–36.
22. Rao LS, Usha Rani P, Deshmukh PS, Kumar PA and Pangulari SK. 2006. RAPD and ISSR fingerprinting in cultivated chickpea (*Cicer arietinum* L.) and its wild progenitor *Cicer reticulatum* Ladizinsky. Genetic Resources and Crop Evolution 54: 1235–1244.
23. Sharma M, Varshney RK, Rao JN, Seethe K, Hoisington D and Pande S. 2009. Genetic diversity in Indian isolates of *Fusarium oxysporum* f.sp. *ciceri* chickpea wilt pathogen. African Journal of Biotechnology 6: 1016–1023.
24. Souframanien J and Gopalakrishna T. 2004. A comparative analysis of genetic diversity in blackgram genotypes using RAPD and ISSR markers. Theoretical and Applied Genetics 109: 1687–1693.
25. Tanno k and Wilcox GW. 2006. The origins of cultivation of *Cicer arietinum* L. and *Vicia faba* L.: early finds from tell el-Kerch, North West Syria, Late 10th millennium B.P. Vegetation History and Archaeobotany 15:197–204.
26. Terzopoulos PJ and Bebeli PJ. 2008. Genetic diversity analysis of Mediterranean faba bean (*Vicia fabae* L.) with ISSR markers. Field Crops Research 108: 39–44.
27. Zokaee S, Felahati Rastegar M, Jafarpour B, Bagheri A and Mashhadi Jahanbakhsh V. 2012. Genetic diversity determination of *Fusarium oxysporum* f.sp. *ciceri* the

causal agent of wilting and chlorosis in chickpea by using RAPD and PCR-RFLP techniques in Razavi and Northern Khorasan provinces. Iranian Journal of Pulses Research 3: 7-18.

Genetic diversity of *Fusarium oxysporum* f.sp. *ciceri*, the causal agent of Iranian chickpea vascular wilt in ILAM Province using ISSR markers

M. Azimi¹, S. Rezaee*², S. Beygi³

Abstract

Fusarium wilt disease of Iranian chickpea caused by *Fusarium oxysporum* f.sp. *ciceri* fungus is one of the most important chickpea diseases in Iran. In order to study the genetic diversity of this pathogen, 47 isolates were collected from infected areas in Ilam province. After extracting DNA, the genetic diversity of these isolates was analyzed using ISSR molecular markers. Based on the results at the level of 64% similarity coefficient, isolates were clustered into 24 groups. This result demonstrates the high genetic diversity among the isolates in Ilam province. Based on information obtained from ISSR primers were among six studied populations, the highest genetic distance was found to be 0.054 between Sarableh and Sirvan populations and the lowest genetic distance as 0.010 between Asemanabad and Shabab populations. Gene flow and genetic differentiation using Pop GEN software showed that gene flow is related to ISSR₅ with its amount as 18.27 and the lowest value was related to ISSR₇ with its amount as 1.65 and the mean gene flow was calculated as 4.60. In this research, the mean flow was 0.098. The calculated genetic variance was 6% between the populations and as well as to be 94% in populations. High genetic variation between and among populations shows the potential different aggressiveness of isolates. This shows the importance of the dominant pathotype(s) identification in the region as well as using them in the process of introduction new resistant cultivars.

Keywords: *Fusarium oxysporum* f.sp. *ciceri*, genetic diversity, ISSR micro satellite marker.

¹- Former MSc student, Department of Plant Pathology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

²- Assistant Professor, Department of Plant Pathology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

³- Assistant Professor, Plant Protection management, Agriculture organization of Ilam, Ilam, Iran.

*Corresponding author: srezaee65@gmail.com